

УДК 57.083.3

# Получение и исследование свойств рекомбинантного иммуноглобулина А, специфичного к гемагглютиниnam вируса гриппа

Т. К. Алиев<sup>1\*</sup>, И. Г. Дементьева<sup>2</sup>, В. А. Топорова<sup>3</sup>, В. В. Аргентова<sup>4</sup>, Л. П. Позднякова<sup>2</sup>, М. Н. Боков<sup>2</sup>, Ю. А. Вотчицева<sup>4</sup>, Д. А. Долгих<sup>3,4</sup>, С. Д. Варфоломеев<sup>1</sup>, П. Г. Свешников<sup>2</sup>, М. П. Кирпичников<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

<sup>2</sup>Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, 117149, Москва, Симферопольский бульвар, 8

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: ta12345@list.ru

Поступила в редакцию 13.06.2017

Принята к печати 16.04.2018

**РЕФЕРАТ** Получены рекомбинантные варианты человеческого антитела FI6, проявляющие широкую специфичность к гемагглютиниnam вируса гриппа А. На основе бипромоторного вектора (CMV, hEF1-HTLV) получены генетические конструкции, экспрессирующие тяжелую и легкую цепи иммуноглобулинов IgA1-, IgA2m1- и IgG-изотипов. В результате трансфекции и селекции клеток СНО яичников китайского хомячка получены клеточные линии, стабильно экспрессирующие указанные антитела. Иммуноглобулины изотипов IgA1, IgA2m1 и IgG выделены из культуральной жидкости. Определены иммунохимические характеристики антител, изучено взаимодействие рекомбинантных иммуноглобулинов со штаммами вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2. Показано, что рекомбинантные варианты FI6 IgA-изотипа проявляют, как и исходное антитело, специфичность в отношении всех исследуемых штаммов. При этом наибольший уровень связывания достигается для подтипа H1N1, относящегося к гемагглютиниnam филогенетической группы I. **КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вирус гриппа А, широко нейтрализующие антитела, иммуноглобулин А, IgA1, IgA2m1, рекомбинантные антитела.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВГА – вирус гриппа А; MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота; ИФА – иммуноферментный анализ;  $K_d$  – константа диссоциации.

## ВВЕДЕНИЕ

Пассивная иммунотерапия с использованием антител к компонентам вирусного капсида является перспективным направлением разработки новых лекарственных средств для борьбы с гриппом [1, 2]. Этот подход приобретает особое значение в связи с высокой изменчивостью поверхностных антигенов вируса гриппа А (ВГА), приводящей к уменьшению эффективности вакцин и низкомолекулярных терапевтических средств. С целью создания универсальных препаратов широкой специфичности на протяжении последних лет ведется активный поиск нейтрализующих моноклональных антител (мАТ), проявляю-

щих перекрестную реактивность в отношении различных серотипов ВГА [3–7]. Наибольший успех был достигнут в результате масштабного скрининга более 100000 отдельных культивированных антителопродуцирующих В-клеток нескольких доноров, у которых наблюдали значительную гетеротипичность иммунного ответа в отношении ряда подтипов ВГА [8]. Найдено уникальное антитело FI6, обладающее способностью связывать рекомбинантные и природные гемагглютинины филогенетических групп I и II. Широкая специфичность данного антитела, по видимому, обусловлена тем, что оно взаимодействует с консервативным эпитопом в субдомене F молекулы

гемагглютина, менее подверженном мутагенезу, чем домен HA1. На мышцах и хорьках, инфицированных штаммами ВГА H1N1 и H5N1 в летальной дозе, показано, что полная защита достигается при введении данного антитела в дозе 2–20 мг/кг веса. Открытие подобного универсального антитела открывает широкие возможности для создания на его основе различных рекомбинантных вариантов иммуноглобулинов.

Дыхательные пути представляют основной путь проникновения ВГА в организм, поэтому интраназальное введение нейтрализующих антител может значительно способствовать повышению эффективности пассивной иммунотерапии [9, 10]. В случае интраназального введения препаратов значительный интерес вызывает возможность использования рекомбинантного иммуноглобулина А, наиболее представительного класса антител на слизистых оболочках человека [11]. Иммуноглобулины класса А присутствуют в различных изоформах (мономер, димер, секреторная форма), в зависимости от структуры они способны задействовать различные механизмы нейтрализации вируса. Антитела IgA-изотипа способны блокировать взаимодействие вирусов с поверхностью клеток человека, осуществлять внутриклеточную нейтрализацию вирусных частиц, посредством привлечения и активации нейтрофилов способствовать уничтожению зараженных клеток [12].

Цель настоящего исследования заключалась в получении рекомбинантных аналогов антитела FI6 в формате иммуноглобулина А и сравнение его иммунохимических свойств со свойствами аналогичного антителам IgG-изотипа.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Конструирование бипромоторной плазмиды для экспрессии рекомбинантного антитела FI6 IgG1-изотипа

Ранее мы синтезировали [13] нуклеотидные последовательности кДНК переменных доменов FI6VHv3 тяжелой и FI6VKv2 легкой цепей антитела FI6 [8].

К 5'-концевой области полученной ранее кДНК переменного домена тяжелой цепи антитела FI6VHv3 методом полимеразной цепной реакции с использованием набора олигонуклеотидных праймеров с попарно перекрывающимися концевыми частями (SOE-PCR) присоединяли фрагмент, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерный пептид MAWVWTLFLMAAAQSAQA и не транскрибируемую регуляторную область. Для создания бипромоторной системы экспрессии полученный в результате SOE-PCR фрагмент ДНК обрабатывали рестриктазами NheI и Bsp120I и клонировали в пред-

обработанную теми же рестриктазами плазмиду pSK+/hEF1-HTLV-BGH [14], содержащую гибридный промотор hEF1-HTLV, полноразмерную константную область IgG1 и сайт полиаденилирования BGH, все вместе фланкированные сайтами узнавания рестриктазы MluI. Таким образом была получена плазида pSK+/hEF1-HTLV-FI6HG1-BGH.

По аналогии с тяжелой цепью получали кДНК легкой цепи антитела человека, адаптированную к экспрессии в клетках эукариот. Методом SOE-PCR объединяли кДНК лидерного пептида MKSQTQVFVFLLLCVSGANG, полученную ранее кДНК переменного домена легкой цепи антитела FI6VKv2 и кДНК константного домена каппа-изотипа человека. Полученный фрагмент ДНК обрабатывали рестриктазами NheI и Sfr274I и клонировали в предобработанную теми же рестриктазами плазмиду pOptiVEC (Invitrogen, США) с предварительно введенным рядом с 5'-концом промотора сайтом узнавания рестриктазы MluI. Таким способом была получена плазида pOpti-FI6L, содержащая ген легкой цепи антитела FI6 под контролем цитомегаловирусного промотора (CMV).

На заключительном этапе получения бипромоторной плазмиды pBiPr-ABIgG1FI6 фрагмент MluI-MluI (2500 п.н.) из плазмиды pSK+/hEF1-HTLV-FI6HG1-BGH встраивали в предобработанный рестриктазой MluI и дефосфорилированный вектор pOpti-FI6L.

### Конструирование бипромоторных плазмид для экспрессии рекомбинантных антител FI6 IgA1- и IgA2m1-изотипов

Константные домены тяжелой цепи IgA1- и IgA2m1-изотипов получали следующим образом. Экзоны соответствующих генов амплифицировали с использованием хромосомной ДНК человека в качестве матрицы и специфических олигонуклеотидных праймеров и клонировали в промежуточный вектор pAL-TA («Евроген», Россия). Экзоны, принадлежащие константным доменам одинаковых изотипов, объединяли с помощью метода SOE-PCR. Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазами SacI и Sfr274I, и каждый из них клонировали совместно с фрагментом NheI-SacI из pSK+/hEF1-HTLV-FI6HG1-BGH, содержащим кДНК лидерного пептида MAWVWTLFLMAAAQSAQA и переменной области тяжелой цепи антитела FI6, в предобработанный рестриктазами NheI и Sfr274I вектор pSK+/hEF1-HTLV-BGH. Таким образом были получены плазмиды pSK+/hEF1-HTLV-FI6HA1-BGH и pSK+/hEF1-HTLV-FI6HA2m1-BGH, содержащие промотор hEF1-HTLV, кДНК лидерного пептида MAWVWTLFLMAAAQSAQA, переменную область тяжелой цепи антитела FI6, кДНК констант-

ного домена IgA1- или IgA2m1-изотипа человека (соответственно) и нетранслируемой области, включающей сайт полиаденилирования BGH, фланкированные сайтами узнавания рестриказы MluI.

На заключительном этапе получения бипромоторных плазмид pBiPr-ABiG1FI6 и pBiPr-ABiG2m1FI6 фрагменты MluI-MluI (2500 п.н.) из плазмид pSK+/hEF1-HTLV-FI6HA1-BGH и pSK+/hEF1-HTLV-FI6HA2m1-BGH соответственно встраивали в преобработанный рестриктазой MluI и дефосфорилированный вектор pOpti-FI6L.

#### Получение клеточных линий-продуцентов рекомбинантных антител

Клетки CHO DG44 (Invitrogen, США) трансфицировали линейаризованными плазмидами pBiPr-ABiG1FI6, pBiPr-ABiG1FI6 и pBiPr-ABiG2m1FI6 с использованием реагента Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) по стандартному протоколу. Первичную селекцию трансфектантов проводили на среде CD OptiCHO (Invitrogen, США) с добавлением 8 мМ L-глутамин (Gibco, США), 0.1% Pluronic F-68 (Gibco, США) и однократного раствора антибиотика/антимикотика (Gibco, США). Для получения стабильной клеточной линии проводили флуоресцентный скрининг и отбор клонов-продуцентов. С этой целью клетки высевали на полутвердую среду CloneMedia (Molecular Devices, США) с добавлением в зависимости от изотипа получаемых рекомбинантных антител, меченных FITC, антител мыши к константным доменам человеческих иммуноглобулинов G (Molecular Devices, США) или A (ВНЦМДЛ, Россия). После 14-дневного культивирования клеток проводили отбор отдельных продуцирующих клонов с использованием установки ClonePix FL (Molecular Devices, США) по интенсивности их флуоресценции. Для дальнейшего повышения продуктивности выбранные клоны культивировали в присутствии увеличивающихся концентраций метотрексата в диапазоне от 20 до 500 нМ.

#### Выделение и очистка рекомбинантных антител

Культуру клеток, продуцирующих рекомбинантные антитела, выращивали в колбах-спиннерах с рабочим объемом 500 мл. Для этого в среду CD OptiCHO объемом 300 мл высевали  $2.5-3.0 \times 10^5$  клеток/мл и выращивали в течение 14-18 дней в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C, 8% CO<sub>2</sub> при скорости перемешивания спиннера 50-70 об/мин.

Культуральную жидкость центрифугировали при 4000 g, к супернатанту добавляли 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES) до концентрации 50 мМ и NaCl до концентрации 150 мМ, pH 5.7.

Культуральную жидкость, содержащую FI6-IgG, наносили на колонку Protein G-Sepharose 4B Fast Flow (диаметр 2.5 см, высота геля 3.5 см, объем 17 мл), предварительно уравновешенную раствором MES pH 5.7, со скоростью рециркуляции 42 мл/ч (8.6 мл/ч × см<sup>2</sup>) в течение 21 ч при 4°C. Антитела элюировали 0.1 М глициновым буфером pH 2.7, скорость элюции 70 мл/ч. Сразу же после получения элюата доводили pH до ~7.5 при помощи 2 М Трис и концентрировали в ультрафильтрационной ячейке (мембрана 30000 NMWL) до объема ~1.5-2 мл, затем диализовали против фосфатного буфера (200-кратный объем), pH 7.4 в течение ночи.

Для аффинной хроматографии FI6-IgA1 и FI6-IgA2m1 получали иммуносорбент на основе моноклональных антител (мАТ) мыши FabH A3 (ВНЦМДЛ, Россия) против каппа-цепи иммуноглобулинов человека. Антитела пришивали к активированной BrCN-сефарозе по методу Каврана [15]. Степень пришивки антител FabH A3 составляет 5 мг на 1 мл сефарозы. pH культуральной жидкости, содержащей антитела FI6-IgA, доводили до 8.0 с помощью 1 М раствора Трис и наносили на колонку рециркуляцией в течение 18 ч со скоростью 15 мл/ч. Для элюции антител FI6-IgA1 и FI6-IgA2m1 последовательно использовали 0.1 М натрий-ацетатный буфер, pH 3.0, 0.5 М NaCl; 0.1 М глициновый буфер, pH 2.5, 0.5 М NaCl; 0.1 М глициновый буфер, pH 2.0, 0.5 М NaCl. Все элюаты нейтрализовали с помощью 1 М раствора Трис.

#### Иммунохимический анализ рекомбинантных антител

В данной работе использовали набор высокоочищенных реликтовых и актуальных штаммов ВГА производства компании Hytest Ltd. (Турку, Финляндия) и НИИ гриппа РАМН (Санкт-Петербург, Россия), полученных из зараженных куриных эмбрионов методом последовательного ультрацентрифугирования с использованием градиента плотности сахарозы с последующей инактивацией мертиолатом в течение 24 ч (табл. 1). Инактивация вирусов подтверждена на культуре клеток MDCK.

Титрование рекомбинантных антител проводили методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). Инактивированные штаммы ВГА сорбировали в концентрации 5 мкг/мл при температуре 4°C в течение ночи в 0.1 М карбонатном буфере pH 9.2-9.4 объемом 50 мкл в лунках 96-луночных планшетов с высокой связывающей способностью (Corning-Costar, Нидерланды). В качестве вторичного антитела для детекции использовали конъюгат мАТ FabH A3 с пероксидазой хрена.

Для проведения иммуноблоттинга проводили электрофоретическое разделение вируса гриппа

Таблица 1. Характеристика использованных вирусных препаратов

Поставщик	Серотип	Штамм/год выделения
Hytest Ltd 8IN73	Influenza A (H1N1)	A/Taiwan/1/86
Hytest Ltd 8IN73-2	Influenza A (H1N1)	A/Beijing/262/95
Hytest Ltd 8IN73-3	Influenza A (H1N1)	A/New Caledonia/20/99
Hytest Ltd 8IN73-4	Influenza A (H1N1)	A/Solomon Islands/03/06
НИИ гриппа	Influenza A (H1N1)	A/California/07/09
Hytest Ltd 8IN74	Influenza A (H3N2)	A/Samara/222/99=A/Shangdong/9/93
Hytest Ltd 8IN74-1	Influenza A (H3N2)	A/Panama/2007/99
Hytest Ltd 8IN74-2	Influenza A (H3N2)	A/Kiev/301/94
Hytest Ltd 8IN74-3	Influenza A (H3N2)	A/Wisconsin/67/05
Hytest Ltd 8IN74-4	Influenza A (H3N2)	A/Brisbane/10/07
НИИ гриппа	Influenza A (H3N2)	A/Sydney/5/97
Hytest Ltd 8IN75-2	Influenza B	B/Tokio/53/99

А штамм A/Solomon Islands/03/06 в 10% полиакриламидном геле в невозстанавливающих условиях. Затем осуществляли электрофоретический перенос (электроблот) белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану S045A330R (Advantec MFS, Inc., США). Перенесенные белки выявляли на нитроцеллюлозной мембране с помощью непрямого ИФА. Для этого мембрану блокировали раствором 5% казеина в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере и трижды промывали PBS-T (10 mM  $K_2HPO_4$ , pH 7.5, 0.145 M NaCl, 0.1% Tween 20). Инкубировали в течение 1 ч на шейкере при комнатной температуре. После трехкратной промывки мембрану инкубировали с раствором соответствующих рекомбинантных антител в концентрации 1 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере в течение 1 ч при 37°C. После трехкратной промывки PBS-T мембрану инкубировали с конъюгатом мАТ FabH A3 с пероксидазой хрена в течение 1 ч при 37°C. Иммуноблот окрашивали, добавляя субстрат (3,3-диаминобензидин, 4-хлор-1-нафтол и пероксид водорода).

$K_d$  комплекса антиген-антитело определяли по методу Фриге [16]. На первом этапе мАТ в постоянной концентрации 1 нМ (150 нг/мл) инкубировали с антигеном, инактивированным штаммом ВГА A(H1N1)/Solomon Islands/03/06, в диапазоне концентраций 0.1–10 нМ (10–1000 нг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре с постоянным перемешиванием на шейкере для достижения термодинамического равновесия в трехкомпонентной системе: свободный антиген, свободное антитело и комплекс антиген-антитело. На втором этапе измеряли концентрации свободных антител методом твердофазного ИФА с иммобилизованным на планшет антигеном. На заключительном этапе рассчитывали величину

$K_d$  по уравнению Клотца [17] с использованием значений общей концентрации антигена и концентрации свободных рекомбинантных антител.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные иммуноглобулины получали с использованием нуклеотидных последовательностей, кодирующих переменные домены FI6VHv3 тяжелой и FI6VKv2 легкой цепей нейтрализующего антитела FI6 широкой специфичности [8]. Такие модифицированные последовательности отличаются от последовательностей, кодирующих тяжелую и легкую цепи иммуноглобулина FI6 тем, что содержат меньше соматических мутаций и в большей степени соответствуют последовательностям переменных доменов зародышевых линий иммуноглобулинов человека.

Для изучения способности антитела FI6 взаимодействовать с ВГА в формате иммуноглобулина А было решено получить рекомбинантные антитела IgA1- и IgA2m1-изотипов. В качестве положительного контроля получено антитело FI6 IgG1-изотипа.

Имуноглобулин А человека представлен двумя изотипами – IgA1 и IgA2. IgA1 превалирует в сыворотке, в то время как в секреторных выделениях выше процентная доля IgA2 [18]. Наиболее существенные структурные отличия между данными изотипами антител связаны с шарнирным участком. Шарнирный участок IgA1 на 13 аминокислотных остатков длиннее, чем у IgA2. Вследствие этого антитела IgA1-изотипа обладают большей подвижностью антигенсвязывающих участков. Такое преимущество IgA1 сопряжено с большей по сравнению с IgA2 уязвимостью к протеолизу в области шарнирных участков [12]. Антитело IgA2-изотипа встречается



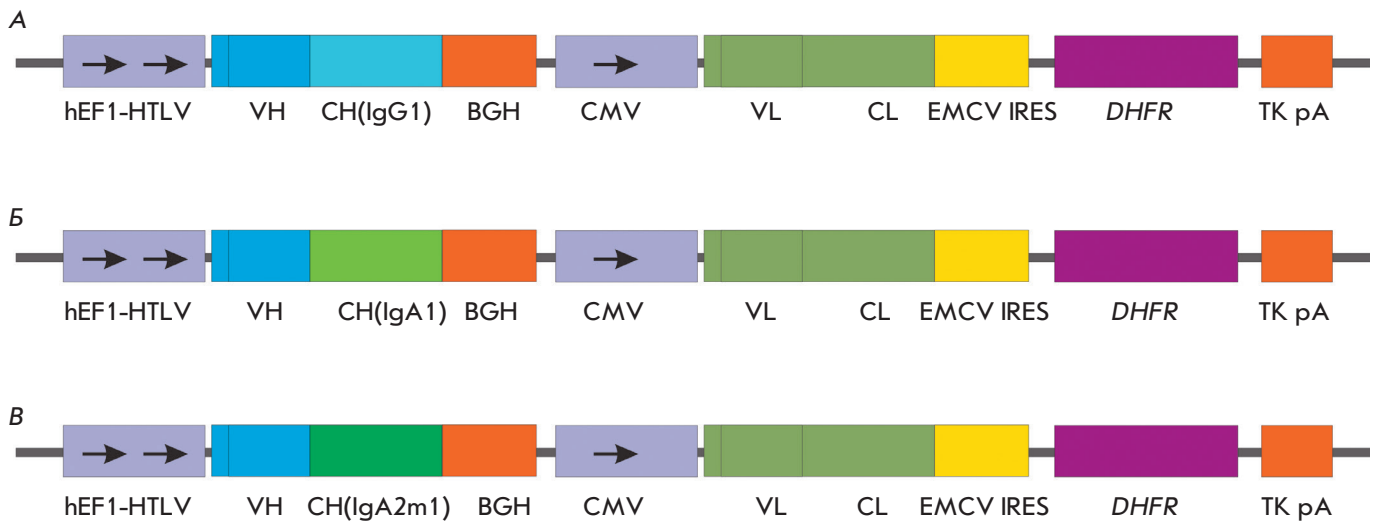


Рис. 1. Схема экспрессионных кассет бипромоторных плазмид для получения антител F16 различных изотипов. А – плазида pBiPr-ABlgG1F16. Б – плазида pBiPr-ABlgA1F16. B – плазида pBiPr-ABlgA2m1F16. hEF1-HTLV – гибридный промотор из плазмиды pMG, состоящий из промотора фактора элонгации EF-1а и 5'-нетранслируемой области вируса Т-клеточного лейкоза человека HTLV; VH – вариабельный домен тяжелой цепи антител; CH(IgG1), CH(IgA1), CH(IgA2m1) – константные домены тяжелой цепи иммуноглобулинов человека IgG1-, IgA1-, IgA2m1-изотипов соответственно; BGH – сайт полиаденилирования; CMV – промотор/энхансер ранних генов цитомегаловируса человека; VL – вариабельный домен легкой цепи антител; CL – константный домен легкой цепи антитела; EMCV IRES – внутренний сайт связывания рибосом (IRES) вируса энцефаломиокардита, DHFR – ген дигидрофолатредуктазы; TK pA – сигнал полиаденилирования тимидинкиназы вируса герпеса

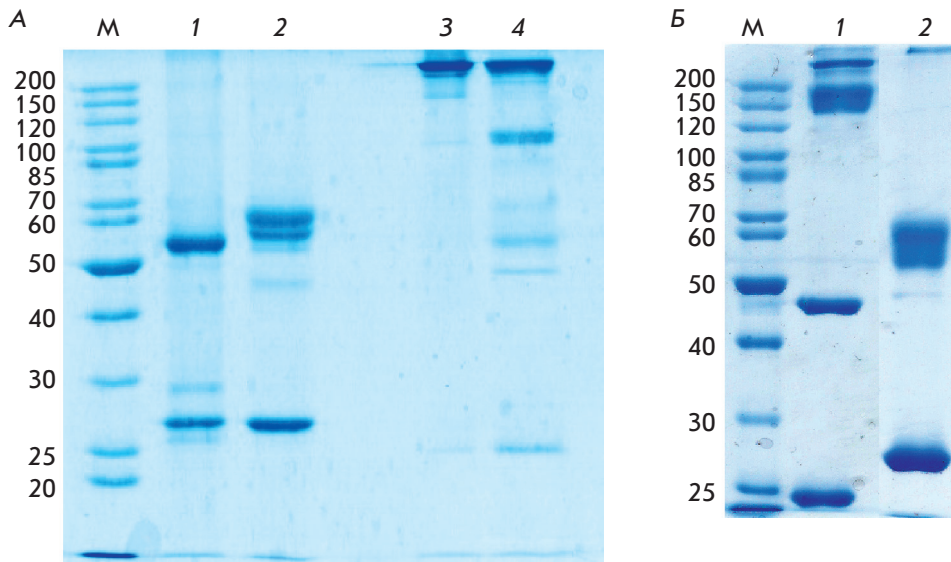
в виде двух аллотипов: IgA2m1 и IgA2m2, которые различаются количеством сайтов гликозилирования и, что весьма существенно, расположением межцепочечных дисульфидных связей [19, 20]. В IgA2m1 отсутствуют типичные для структуры иммуноглобулинов дисульфидные связи между константным доменом легкой и константным доменом тяжелой цепей (CH1). При этом дисульфидная связь образуется между константными доменами легких цепей, а взаимодействие между легкой и тяжелой цепью носит нековалентный характер.

Для экспрессии рекомбинантных антител в клетках CHO предложен бипромоторный вектор, разработанный нами ранее и хорошо зарекомендовавший себя при получении антител. Этот экспрессионный вектор содержит две транскрипционные единицы, промоторы pCMV и hEF1-HTLV, контролирующие транскрипцию тяжелой и легкой цепей антител в одной плазмиде. Плазида также содержит ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), который транслируется через независимый сайт связывания рибосом. Такой вектор позволяет при амплификации копий гена DHFR в хромосоме линий-продуцентов методом селективного давления метотрексата (MTX) одновременно увеличивать копияность генов легкой и тяжелой цепей антител. Получены три экспрессионные

плазмиды, отличающиеся константными доменами тяжелых цепей иммуноглобулинов (рис. 1).

Для наработки рекомбинантных иммуноглобулинов на основе клеток CHO DG44 получены стабильные клеточные линии. Рекомбинантные антитела IgG- и IgA-изотипов выделяли из бессывороточной культуральной среды. После проведения аффинной хроматографии рекомбинантные антитела IgG- и IgA-изотипов анализировали с помощью полиакриламидного гель-электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (рис. 2).

Размер обнаруживаемых фрагментов белков, как показывает анализ гель-электрофореграмм, отражает особенности расположения межцепочечных дисульфидных связей в каждом из исследуемых изотипов. Так, на электрофореграммах антител IgG- и IgA1-изотипов в восстанавливающих условиях появляются две полосы, соответствующие легкой и тяжелой цепям иммуноглобулинов. У антитела IgA2m1-изотипа выявлено свойственное данному изотипу уникальное расположение межцепочечных дисульфидных связей. Как упоминалось ранее, у антител IgA2m1-изотипа отсутствует характерная для большинства иммуноглобулинов межцепочечная дисульфидная связь между константным доменом легкой и CH1-доменом тяжелой цепи. При этом



**Рис. 2.** Гель-электрофореграмма антител FI6 в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. А – 1, 3 – антитела IgG; 2, 4 – антитела IgA1. 1, 2 – в присутствии β-меркаптоэтанола. 3, 4 – в отсутствие β-меркаптоэтанола. Б – антитела IgA2m1 в отсутствие (1) и в присутствии (2) β-меркаптоэтанола. М – маркеры мол. массы, кДа

константные домены легких цепей соединены между собой дисульфидной связью. В невосстанавливающих условиях на гель-электрофореграмме (рис. 2Б) присутствуют димеры легких (~ 46 кДа) и тяжелых цепей (~ 105 кДа).

Антигенсвязывающую активность рекомбинантных белков исследовали методом иммуноблоттинга по отношению к инактивированному штамму гриппа A/Solomon Islands/03/06, относящегося к подтипу H1N1 (рис. 3).

Данные иммуноблоттинга подтверждают способность полученных рекомбинантных антител узнавать нативный гемагглютинин ВГА. При этом подтверждаются результаты, полученные нами ранее на примере Fab-фрагмента антитела FI6 IgG1-изотипа [13], свидетельствующие о том, что антитело FI6 способно взаимодействовать как с цельным гемагглютинином HA0, так и с фрагментами HA1 и HA2, которые

образуются в результате гидролиза целого белка при гель-электрофорезе в восстанавливающих условиях [21]. Эти результаты согласуются с данными эпитопного картирования антитела FI6, приведенными в работе [8]. Широкая специфичность FI6 обусловлена тем, что оно взаимодействует с консервативным эпитопом в F-субдомене гемагглютинаина, расположенного на стыке доменов H1 и H2. При этом тяжелая цепь антитела взаимодействует с доменом H1, а легкая цепь – с альфа-спиралью из домена H2.

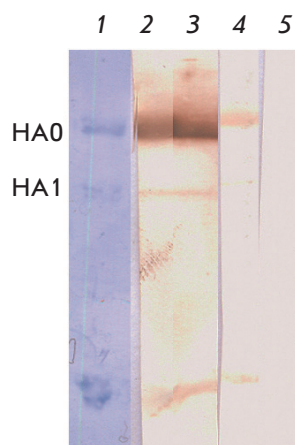
Представляла интерес способность антител IgA-изотипа взаимодействовать с различными подтипами ВГА. Антитела IgA1- и IgA2m1-изотипов сравнивали методом непрямого ИФА с использованием различных инактивированных штаммов ВГА подтипов H1N1 и H3N2, иммобилизованных на твердой фазе.

Проведенный иммунохимический анализ (рис. 4 и 5) свидетельствует о том, что рекомбинантные антитела IgA1- и IgA2m1-изотипов обладают способностью узнавать штаммы обоих изотипов, относящихся к различным филогенетическим группам. При этом сродство рекомбинантных антител IgA1- и IgA2m1-изотипов к некоторым штаммам исследованных подтипов отличается. Наибольшее отличие наблюдается в отношении штаммов подтипа H3N2, интенсивность взаимодействия которых с антителами IgA2m1-изотипа значительно ниже, чем с антителами IgA1-изотипа.

Полученные результаты согласуются с данными [8], из которых следует, что антитела FI6, обладая способностью узнавать 16 подтипов ВГА, характеризуются различной силой связывания штаммов разных подтипов.

Для трех полученных рекомбинантных антител определены константы диссоциации комплекса

**Рис. 3.** Иммуноблот рекомбинантных антител FI6 с белками штамма ВГА A/Solomon Islands/03/06 (H1N1). 1 – результаты электрофореза белков ВГА до переноса на мембрану. 2 – иммуноблот с антителами FI6 IgG1-изотипа. 3 – иммуноблот с антителами FI6 IgA1-изотипа. 4 – иммуноблот с антителами FI6 IgA2m1-изотипа. 5 – контроль вторичного конъюгата (иммуноблот в отсутствие рекомбинантных антител)



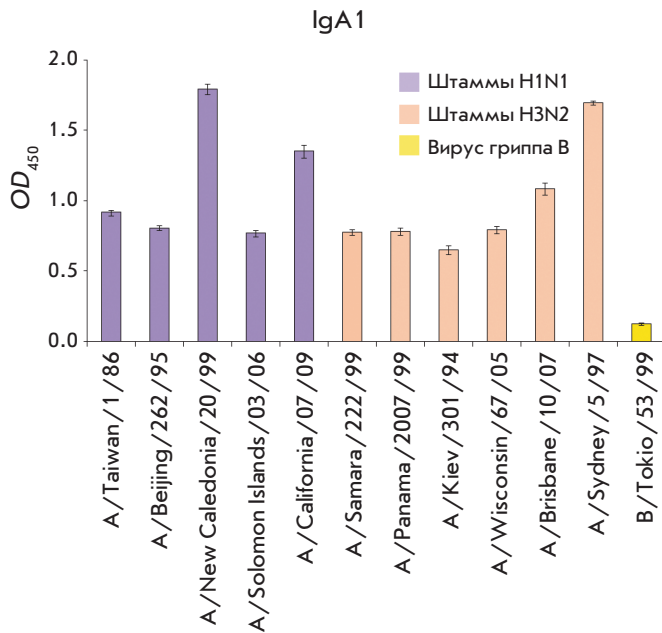


Рис. 4. Непрямой иммуноферментный анализ взаимодействия штаммов ВГА Н1N1 и Н3N2 с рекомбинантными антителами FI6 IgA1-изотипа

антиген-антитело применительно к штамму ВГА А(Н1N1)/ Solomon Islands/03/06 в качестве антигена (табл. 2).

Значения  $K_d$  рекомбинантных антител IgA1 и IgA2m1 отличаются в 4 раза. При этом у IgA1 значение  $K_d$  даже несколько меньше, чем у IgG1, что свидетельствует о большей силе связывания и, возможно, вызвано большей подвижностью антигенсвязывающих участков переменных доменов, обусловленной, в свою очередь, уникальной структурой шарнирного участка IgA1. В целом, проведенные исследования показывают, что получение антитела FI6 в формате IgA не ухудшает его антигенсвязывающих свойств. Необходимо отметить, что неизменность антигенсвязывающих и нейтрализующих свойств при изменении изотипа антитела не является само собой разумеющимся, о чем свидетельствуют данные [22]. Показано, что химерное (мышь-человек) антитело 9F4 к гемагглютинуину подтипа Н5N1 в формате IgA1 характеризуется меньшей нейтрализующей активностью по сравнению с исходным антителом мыши и химерным аналогом IgG-изотипа.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе переменных доменов антитела FI6 к гемагглютинуину вируса гриппа А, проявляющего широкую специфичность, получены рекомбинантные мономерные антитела IgA1- и IgA2m1-изотипов. Эти антитела распознают 10 реликтовых и актуальных

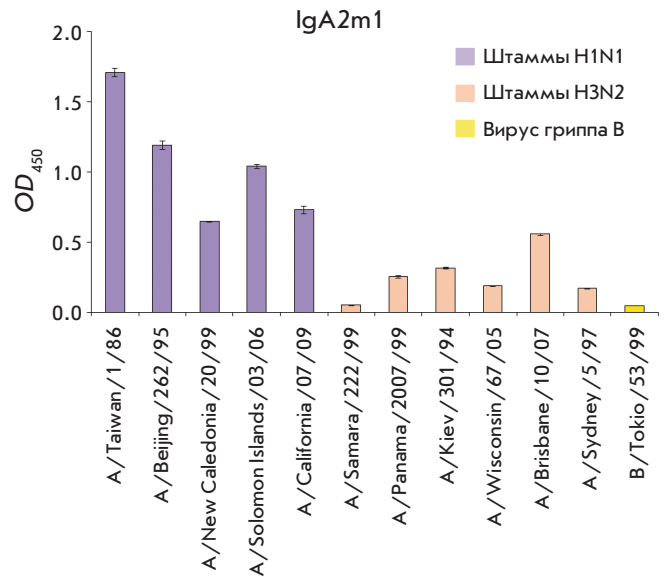


Рис. 5. Непрямой иммуноферментный анализ взаимодействия штаммов ВГА подтипов Н1N1 и Н3N2 с рекомбинантными антителами FI6 IgA2m1-изотипа

Таблица 2. Сравнение  $K_d$  рекомбинантных антител FI6 IgG- и IgA-изотипов

Антитело	$K_d$ , нМ
IgG1	1.2–1.8
IgA1	0.7–1.5
IgA2m1	3.3–3.9

штаммов ВГА в непрямом ИФА и характеризуются значением константы диссоциации комплекса антиген-антитело не выше 4 нМ. Аффинность исследованных образцов антител по отношению к штаммам ВГА подтипа Н1N1 выше, чем по отношению к штаммам подтипа Н3N2. Данные проведенного исследования показывают, что получение антитела FI6 в формате мономерной формы иммуноглобулина А не приводит к изменению его антигенсвязывающих свойств, что является важной предпосылкой для использования антител IgA-изотипа в терапевтических целях. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке субсидии (соглашение № 14.607.21.0060), выделяемой Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках реализации Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0060).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gerhard W. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001. V. 260. P. 171–190.
2. Lachmann P. // *Emerging Microbes Infections.* 2012. V. 1. e11; doi: 10.1038/emi.2012.2
3. Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., et al. // *PLoS One.* 2008. V. 3. e3942.
4. Sui J., Hwang W.C., Perez S., Wei G., Aird D., Chen L.M., Santelli E., Stec B., Cadwell G., Ali M., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. V. 16. P. 265–273.
5. Friesen R.H., Koudstaal W., Koldijk M.H., Weverling G.J., Brakenhoff J.P., Lenting P.J., Stittelaar K.J., Osterhaus A.D., Kompier R., Goudsmit J. // *PLoS One.* 2010. V. 5. e9106.
6. Wrammert J., Koutsonanos D., Li G.M., Edupuganti S., Sui J., Morrissey M., McCausland M., Skountzou I., Hornig M., Lipkin W.I., et al. // *J. Exp. Med.* 2011. V. 208. № 1. P. 181–193.
7. Grandea A.G., Olsen O.A., Cox T.C., Renshaw M., Hammond P.W., Chan-Hui P.Y., Mitcham J.L., Cieplak W., Stewart S.M., Grantham M.L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 28. P. 12658–12663.
8. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., et al. // *Science.* 2011. V. 333. № 6044. P. 850–856.
9. Tamura S., Kurata T. // *Jpn J. Infect. Dis.* 2004. V. 57. № 6. P. 236–247.
10. Weltzin R., Monath T.P. // *Clin. Microbiol. Rev.* 1999. V. 12. № 3. P. 383–393.
11. Jianqiang Y., Hongxia S., Perez D.R. // *Immunotherapy.* 2012. V. 4. № 2. P. 175–186.
12. Bakema J.E., van Egmond M. // *MAbs.* 2011. V. 3. № 4. P. 352–361.
13. Алиев Т.К., Дементьева И.Г., Топорова В.А., Боков М.Н., Позднякова Л.П., Рыбченко В.С., Долгих Д.А., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 16. Биология.* 2016. № 2. С. 25–31.
14. Алиев Т.К., Балабашин Д.С., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Панина А.А., Топорова В.А. Патент Российской Федерации на изобретение № 2555533. 2015.
15. Kavran J.M., Leahy D.J. // *Methods Enzymol.* 2014. V. 541. P. 27–34.
16. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. // *J. Immunol. Methods.* 1985. V. 77 (2). P. 305–319.
17. Klotz I.M. // *Arch. Biochem.* 1946. V. 9. P. 109–117.
18. Delacroix D.L., Dive C., Rambaud J.C., Vaerman J.P. // *Immunology.* 1982. V. 47. № 2. P. 383–385.
19. Tomana M., Niedermeier W., Mestecky J., Skvaril F. // *Immunochemistry.* 1976. V. 13. № 4. P. 325–328.
20. Chintalacheruvu K.R., Raines M., Morrison S.L. // *J. Immunol.* 1994. V. 152. № 11. P. 5299–5304.
21. Feshchenko E., Rhodes D.G., Felberbaum R., McPherson C., Rininger J.A., Post P., Cox M.M.J. // *BMC Biotechnology.* 2012. 12:77 <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/12/77>.
22. Mak T.-M., Hanson B.J., Tan Y.-J. // *Antiviral Res.* 2014. V. 107. P. 76–83.